

応用生物科学科 2003 年研究業績

A. 研究発表

1. 論文

- (1) Mechanisms of accumulation of arachidonate in phosphatidylinositol in yellowtail: A comparative study of acylation systems of phospholipids in rat and the fish species *Seriola quinqueradiata*
Tamotsu Tanaka, Dai Iwawaki, Masahiro Sakamoto, Yoshimichi Takai, Jun-ichi Morishige, Kaoru Murakami, and Kiyoshi Satouchi
Eur. J. Biochem. 270, 1466-1473 (2003)

It is known that phosphatidylinositol (PtdIns) is abundant in arachidonate and composed mainly of 1-stearoyl-2-arachidonoyl species in mammals. In the present study, we investigated whether this characteristic of PtdIns is applicable to the PtdIns from yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), a marine fish. Common to phosphatidylcholine (PtdCho), phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine from all tissues investigated, the predominant polyunsaturated fatty acid was docosahexaenoic acid (DHA), and levels of arachidonic acid ranged from 1.2% to 4.5%, from 1.6% to 7.5% and from 0.5% to 3.0%, respectively. In striking contrast, arachidonic acid made up 17.6%, 31.8%, 27.8%, 26.1%, 25.4% and 33.5% of fatty acid compositions of the PtdIns from brain, heart, liver, spleen, kidney and ovary, respectively. The most abundant molecular species of PtdIns was 1-stearoyl-2-arachidonoyl throughout these tissues. Acyltransferase assay with liver microsomes of yellowtail showed that arachidonic acid was incorporated into PtdIns more effectively than DHA and that DHA inhibited incorporation of arachidonic acid into PtdCho without inhibiting the utilization of arachidonic acid for PtdIns. The latter DHA effect was not observed in similar experiments using rat liver microsomes and thought to be one of the mechanisms for exclusive utilization of arachidonic acid for acylation to PtdIns in yellowtail.

- (2) Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis
Virginie Molle, Yoshiko Nakaura, Robert P. Shivers, Hirotake Yamaguchi, Richard Losick, Yasutaro Fujita, and Abraham L. Sonenshein,

J. Bacteriol., 185, 1911-1922 (2003)

Additional targets of CodY, a GTP-activated repressor of early stationary-phase genes in *Bacillus subtilis*, were identified by combining chromatin immunoprecipitation, DNA microarray hybridization, and gel mobility shift assays. The direct targets of CodY newly identified by this approach included regulatory genes for sporulation, genes that are likely to encode transporters for amino acids and sugars, and the genes for biosynthesis of branched-chain amino acids.

(3) Identification of additional TnrA-regulated genes of *Bacillus subtilis* associated with a TnrA box

Ken-ichi Yoshida, Hirotake Yamaguchi, Masaki Kinehara, Yo-hei Ohki, Yoshiko Nakaura, and Yastaro Fujita,
Mol. Microbiol., 49, 157-165 (2003)

Bacillus subtilis TnrA is a global regulator that responds to the availability of nitrogen sources and both activates and represses many genes during nitrogen-limited growth. In order to obtain a holistic view of the gene regulation depending on TnrA, we performed a genome-wide screening for TnrA-regulated genes associated with a TnrA box. A combination of DNA microarray hybridization and a genome-wide search for TnrA boxes allowed us to find 36 TnrA-regulated transcription units associated with a putative TnrA box. Gel retardation assaying, using probes carrying at least one putative TnrA box and the deletion derivatives of each box, indicated that 17 out of 36 transcription units were likely TnrA targets associated with the TnrA boxes, two of which (*nasA* and *nasBCDEF*) possessed a common TnrA box. The sequences of these TnrA boxes contained a consensus one, TGTNANAWWTMTNACA. The TnrA targets detected in this study were *nrgAB*, *pucJKLM*, *glnQHMP*, *nasDEF*, *oppABCDF*, *nasA*, *nasBCDEF* and *ywrD* for positive regulation, and *gltAB*, *pel*, *ywdIJK*, *ycyCB*, *yttA*, *yxcC*, *ywlFG*, *yodF* and *alsT* for negative regulation, *nrgAB* and *gltAB* being well-studied TnrA targets. It was unexpected that the negatively regulated TnrA targets were as many as the positively regulated targets. The physiological role of the TnrA regulon is discussed.

(4) Structural and physicochemical properties of endosperm starches of double- and triple-mutants containing the *Amylose-extender* gene in the inbred Oh43 maize background

Yoshinori Utumi, David V. Glover, Naoyoshi Inouchi, and Hidetsugu Fuwa,

J. Appl. Glycosci., 50, 295-296 (2003) Proceedings of the International Symposium : New approaches in starch science and carbohydrate-active enzymes.

Many recessive genes of maize have been identified that alter the quality and quantity of starch in the endosperm, for example, amylose-extender (*ae*), dull (*du*), sugary 2 (*su2*), shrunken 1 (*sh1*), shrunken 2 (*sh2*), brittle 1 (*bt1*) and brittle 2 (*bt2*) genes. The *ae* starch contained high apparent amylose and intermediate fractions extracted by gel permeation chromatography (GPC) of isoamylase-debranched materials, and showed higher gelatinization temperature and lower susceptibility to amylase in comparison to normal maize. The properties of other single-mutant starches have been also investigated. However, the properties of starches of double- and triple-mutants containing the recessive *ae* gene have not been sufficiently investigated. We have investigated structural and physicochemical properties of endosperm starches of double- and triple-mutants containing the *ae* gene by GPC, HPAEC-PAD, and DSC. There were great differences among amylose contents, chain-length distributions in amylopectin, gelatinization temperature and enthalpy of gelatinization of starches of double- and triple-mutants containing the recessive *ae* gene. For example, the ratios of unit chains with DP less than 18 in amylopectin of *ae*, *ae;su2* and *ae;sh1* starches were greatly reduced, those of *ae;bt1* and *ae;sh4* starches were slightly reduced in comparison with normal starch and those of *ae;sh2* and *ae;bt2* starches were nearly similar to that of normal starch.

- (5) Properties of Amaranth starches of *Amaranthus cruentus* and *A. caudatus*
Naoyoshi Inouchi, Kazuhiro Nemoto, Kyohei Taguchi, Yuri Maeda and Hidetsugu Fuwa,
J. Appl. Glycosci., 50, 296-297 (2003) Proceedings of the International Symposium : New approaches in starch science and carbohydrate-active enzymes.

Amaranth has potential agricultural importance because its seeds are generally higher in protein, fat, ash, and fiber in comparison to common cereals. Moreover, the amino acid balance of these seeds is better than that of wheat and maize because the first limiting amino acid, lysine, is present in a relatively higher amount in these seeds. However, the main components of the seeds are starches. It is also known that the size of amaranth starch is small (mean particle size, around 1-1.5 μ m) and starch granules of amaranth are easily hydrolysed by amylase. We have already shown that there are normal, waxy, and

low-amylose types in amaranth starches of *Amaranthus* (*A.*) *cruentus*. However, there are no data on waxy type in amaranth starch of *A. caudatus*. We have investigated the structure and physicochemical properties of starches of *A. cruentus* and *A. caudatus* from different places of origin. We have found waxy type in amaranth starch of *A. caudatus*. The amounts of chains with DP from 6 to 12 in amylopectin of all starch samples of *A. caudatus* were higher than those of *A. cruentus*. The peak temperature of amaranth starches of *A. caudatus* were lower than that of *A. cruentus*.

- (6) Intramolecular electron-transfer pathway for deoxy and zinc myoglobins modified with N, N, N, N', N''- diethylenetriaminepeptaacetatocobaltate (III)
Keiichi Tsukahara, Mari Nishimine, Yuka, Shinoyama, Hiroshi Takashima, and Junzo Hirose
Bull. Chem. Soc. Jpn. 76, 2135-2142 (2003)

Horse heart metmyoglobin(metMb), whose N-terminal Gly 1 is linked N, N, N', N'', N''- diethylenetriaminepeptaacetatocobaltate(III) ion([CoIII(dtpa)]) with an amide bond, was prepared and characterized. A one-electron reduced protein, [deoxyMb{CoIII(dtpa)}], was prepared by reduction with a methylviologen-radical cation, which was produced *in situ* by photoreduction using a tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) ion in the presence of disodium dihydrogen ethylenediaminetetraacetate at 25 °C, pH 7.5 (a 0.010 mol dm⁻³ tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl buffer), and an ionic strength of 0.5 mol dm⁻³ (NaCl).

- (7) Targeting tuberculosis and malaria through inhibition of enoyl reductase: compound activity and structural data
M.R. Kuo, H.R. Morbidoni, D. Alland, S.F. Sneddon, B.B. Gourlie, M.M. Staveski, M. Leonard, J.S. Gregory, A.D. Janjigian, C. Yee, J.M. Musser, B. Kreiswirth, H. Iwamoto, R. Perozzo, W.R. Jacobs Jr., J.C. Sacchettini, and D.A. Fidock
J. Biol. Chem., 278(23), 20851-20859 (2003)

Tuberculosis and malaria together result in an estimated 5 million deaths annually. The spread of multidrug resistance in the most pathogenic causative agents, *Mycobacterium tuberculosis* and *Plasmodium falciparum*, underscores the need to identify active compounds with novel inhibitory properties. Although genetically unrelated, both organisms use a type II fatty-acid synthase system. Enoyl acyl carrier protein reductase (ENR), a key type II enzyme, has been repeatedly validated as an effective antimicrobial

target. Using high throughput inhibitor screens with a combinatorial library, we have identified two novel classes of compounds with activity against the *M. tuberculosis* and *P. falciparum* enzyme (referred to as InhA and PfENR, respectively). The crystal structure of InhA complexed with NAD⁺ and one of the inhibitors was determined to elucidate the mode of binding. Structural analysis of InhA with the broad spectrum antimicrobial triclosan revealed a unique stoichiometry where the enzyme contained either a single triclosan molecule, in a configuration typical of other bacterial ENR:triclosan structures, or harbored two triclosan molecules bound to the active site. Significantly, these compounds do not require activation and are effective against wild-type and drug-resistant strains of *M. tuberculosis* and *P. falciparum*. Moreover, they provide broader chemical diversity and elucidate key elements of inhibitor binding to InhA for subsequent chemical optimization.

(8) Synthesis of new glycosides by transglycosylation of N-acetylhexosaminidase from *Serratia marcescens* YS-1.

Masahiro Kurakake, Takesi Goto, Kanako Ashiki, Yoshimi Suenaga, and Toshiaki Komaki

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 1701-1705 (2003).

Serratia marcescens YS-1, a chitin-degrading microorganism, produced mainly N-acetylhexosaminidase. The purified enzyme had an optimal pH of about 8-9 and remained stable at 40°C for 60 min at pH 6-8. The optimum temperature was around 50°C and enzyme activity was relatively stable below 50°C. YS-1 N-acetylhexosaminidase hydrolyzed *p*-nitrophenyl- β -N-acetylgalactosamide by 28.1% relative to *p*-nitrophenyl- β -N-acetylglucosamide. The N-acetylchitooligosaccharides were hydrolyzed more rapidly, but the cellobiose and chitobiose of disaccharides that had the same β -1,4 glycosidic bond as di-N-acetylchitobiose were not hydrolyzed. YS-1 N-acetylhexosaminidase efficiently transferred the N-acetylglucosamine residue from di-N-acetylchitobiose (substrate) to alcohols (acceptor). The transfer ratio to methanol achieved up to 86% in a reaction in 32% methanol. N-acetylglucosamine was transferred to the hydroxyl group at C1 of monoalcohols. A dialcohol was used as an acceptor when the carbon number was more than 4 and a hydroxyl group existed on each of the two outside carbons. Sugar alcohols with hydroxyl groups in all carbon positions were not proper acceptors.

2. 報文

3. 口頭発表

- (1) ホスファチジルイノシトールに於ける疎水鎖構造単一性の意義
盛重純一、高井誠道、岩脇 大、田中 保、里内 清
第 44 回日本生化学会中国・四国支部例会（岡山）プログラム・講演抄録、p. 42
(2003-5)
- (2) ウコギ葉熱水抽出物の肥満抑制作用
吉積一真、辻 智子、村上 薫、田中 保、菊田安至、里内 清
新素材探索研究会 (2003-5)

ウコギ (*Acanthopanax sieboldianus*) は、米沢地方で救荒作物として古くから栽培され、その葉は食用としても利用されている。近年、ウコギの葉に多量のサポニン類やポリフェノール類が含まれていることが報告され、その抗酸化作用について詳しく研究されている。我々は以前の研究で、ウコギ葉の熱水抽出物が、膵臓リパーゼの活性を阻害し、その活性成分が hederagenin を基本骨格とするトリテルペノイド型のサポニン類であることを見出した。今回、ウコギ葉熱水抽出物の肥満抑制作用について検討を行った。ウコギ葉熱水抽出物は *in vivo* でのコーン油負荷ラットにおける血中の中性脂肪濃度の上昇を経時的に抑制した。更に、ウコギ葉熱水抽出物は、高脂肪食摂取マウスの体重の増加を抑制した。また、血中のレプチン、インスリン濃度は、普通食群に比べ高脂肪食群では有意に増加し、ウコギ葉熱水抽出物投与群では有意な差は認められなかったものの、低下する傾向を示した。

- (3) ポリメチレン中断型脂肪酸を必須脂肪酸に変換する新規な代謝経路
田中 保、盛重純一、岩脇 大、福原輝美、濱村直美、村上 薫、里内 清、大隅 隆
第 45 回 日本脂質生化学研究会・研究集会、2003 年度大会（仙台）、脂質生化学研究、45、p. 271-274 (2003-6)

ポリメチレン中断型不飽和脂肪酸は二重結合間が数個のメチレンで中断された脂

脂肪酸で、多くの裸子植物に含まれている。このポリメチレン中断型不飽和脂肪酸を必須脂肪酸に変換する代謝系が高等動物に存在することを明らかにした。たとえば、シアドン酸(20:3, Δ -5,11,14)はペルオキシソームの β 酸化系にてC4ユニットの鎖長短縮を受け、C16の不飽和脂肪酸(16:2, Δ -7,10)となった後、ミクロソームの鎖長伸長酵素系で代謝され、リノール酸(18:2, Δ -9,12)に代謝される。

(4) ウコギ葉熱水抽出物の抗肥満作用

吉積一真、辻 智子、村上 薫、田中 保、菊田安至、里内 清

日本脂質栄養学会第11回大会、(東京)脂質栄養学 12、p. 154 (2003-9)

ウコギ (*Acanthopanax sieboldianus*) は、米沢地方で救荒作物として古くから栽培され、その葉は食用としても利用されている。近年、ウコギの葉に多量のサポニン類やポリフェノール類が含まれていることが報告され、その抗酸化作用について詳しく研究されている。ウコギ葉熱水抽出物は *in vivo* でのコーン油負荷ラットにおける血中の中性脂肪濃度の上昇を経時的に抑制した。更に、ウコギ葉熱水抽出物は、高脂肪食摂餌マウスの体重の増加を抑制し、糞便中へのTG量の排泄を増加させた。これらの結果から、ウコギ葉熱水抽出物は、膵臓リパーゼの活性を阻害して脂肪の腸管からの消化・吸収を抑制することにより、肥満抑制作用を示すことが示唆された。

(5) リゾホスファチジルイノシトールの分子種分析とその生理活性

岩脇 大、盛重純一、村上 薫、田中 保、里内 清

平成 15 年度日本農芸化学会西日本支部、中国・四国支部、日本栄養・食糧学会西日本支部、日本食品科学工学会西日本支部鹿児島合同大会およびシンポジウム(鹿児島)講演要旨集、p. 38 (2003-9)

(6) ウコギ葉熱水抽出物による抗肥満作用

村上 薫、村上 蘭、田中 保、菊田安至、吉積一真、辻 知子、里内 清

平成 15 年度日本農芸化学会西日本支部、中国・四国支部、日本栄養・食糧学会西日本支部、日本食品科学工学会西日本支部鹿児島合同大会およびシンポジウム(鹿児島)講演要旨集、p. 38 (2003-9)

(7) Sensitive analysis of lysophosphatidic acid by MALDI-TOF-MASS using Phos-tag™ complex

Tamotsu Tanaka, Jun-ichi Morishige, Tohru Koike, Akira Tokumura, Kiyoshi

Satouchi

第 76 回 日本生化学会（横浜）、日本生化学大会発表抄録集、75、p. 75
(2003-10)

Lysophosphatidic acid (LPA) is a lipid mediator with diverse biological effect, such as cell proliferation. LPA is known to exist in blood and saliva, and considered to act as a wound-healing hormone. Here, we report a highly sensitive method for LPA detection by MALDI-TOF-MASS using N,N,N',N'-tetrakis(pyridin-2-ylmethyl)-1,3-diamino-2-propanolato-dizinc(II) complex (Phos-tagTM), a compound that specifically binds to phosphomonoester dianion moiety. TOF-MASS of LPA and LPA-Phos-tag complex were conducted with 3,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and 2',4',6'-trihydroxy-acetophenone as a matrix, respectively, and positive ion detection mode was employed. When LPA was analyzed with Phos-tagTM, only LPA-Phos-tag-complex-ion was detected. In striking contrast, Phos-tag-complex ions were not detected in the case of analysis of phosphatidylcholine, the most abundant phospholipid in animal cells. Furthermore, the detection limit of LPA-Phos-tag-complex was 100 times lower (~0.1 pmol on sample plate) than that of standard method using LPA with DHB matrix (10 pmol~). LPA was converted to positively charged compound by the formation of LPA-Phos-tag-complex. The formation of positively charged complex would contribute the sensitive detection of LPA. Phos-tagTM has a possibility to become a powerful tool for analysis of LPA extracted from small volumes of body fluids.

(8) Physiological significance of simplicity of molecular species composition of phosphatidylinositol

Jun-ichi Morishige, Yoshimichi Takai, Kaoru Murakami, Tamotsu Tanaka and Kiyoshi Satouchi

第 76 回 日本生化学会（横浜）、日本生化学大会発表抄録集、75、p. 911
(2003-10)

The hydrophobic parts of phosphatidylinositol (PI) are composed mainly of stearic acid (18:0) (*sn*-1) and arachidonic acid (20:4) (*sn*-2) in almost all tissues of rat and also in fish species. However, the physiological significance of the simplicity of PI molecular species is still unclear. Previously, we demonstrated that sciadonic acid (SciA) (20:3, Δ -5*c*,11*c*,14*c*) and juniperonic acid (JA) (20:4, Δ -5*c*,11*c*,14*c*,17*c*) were effective substitutes of arachidonate of PI of Swiss 3T3 cells. In this study, we examined the efficacies of protein kinase C (PKC)-activation by diacylglycerols (DGs) containing SciA

or JA. SciA and JA were prepared from seeds of biota (*Biota orientalis*). DGs containing these fatty acids were prepared from corresponding synthesized phosphatidylcholine. The PKC fraction prepared from rat brains was used for the *in vitro* PKC assay. The mitogenic response of Swiss 3T3 cells was examined by [³H] thymidine incorporation. 18:0/20:4-DG was the most potent activator of PKC among DGs investigated. Efficacies of PKC-activation by 18:0/SciA- and 18:0/JA-DG were both 30% lower than that by 18:0/20:4-DG. Consistent with these results, modification of membrane phospholipids of Swiss 3T3 cells with SciA and JA resulted in the curtailed mitogenic response induced by bombesin. The conserved hydrophobic part of PI (18:0/20:4) in vertebrate is considered to be a suitable structure for the PKC activation.

- (9) Secretion of lysophospholipase D activity from Swiss 3T3 fibroblasts
Chieko Kageyama, Akira Tokumura, Tamotsu Tanaka, Jun-ichi Morishige,
Kiyoshi Satouchi and Kenji Fukuzawa
第 76 回 日本生化学会 (横浜)、日本生化学大会発表抄録集、75、p. 910
(2003-10)

Lysophosphatidic acid (LPA) is an important serum growth factor that proliferates various animal cells including fibroblasts. Our group found an enzymatic activity that produces LPA from lysophosphatidylcholines (LPC) in animal plasma and serum, and identified human plasma lysophospholipase D (lysoPLD) as autotaxin, an ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, that was originally isolated as a tumor cell motility stimulating factor in condition medium of a melanoma cell line. Here, using a convenient enzymatic method for determination of choline released from exogenous LPC, we detected increasing levels of lysoPLD-like activity in the conditioned medium of Swiss 3T3 fibroblasts cultured for 3, 6, 12, 24 and 48 hours after serum withdrawal. The cation-requirement of the lysoPLD-like activity was similar to that of human plasma lysoPLD. Like human plasma lysoPLD, the lysoPLD-like activity in the conditioned medium hydrolyzed various choline lysophospholipids: acyl LPC > alkyl LPC > alkenyl LPC > sphingosylphosphorylcholine. Phorbol myristate acetate had a biphasic effect on the secretion of lysoPLD activity from Swiss 3T3 cells; it inhibited an early phase of the lysoPLD secretion, but later accelerated the secretion. Similar biphasic effect was observed for epidermal growth factor and LPA. These results suggest that autotaxin-like lysoPLD activity released from fibroblasts has a potential role as a local generator of bioactive lysophospholipid mediators.

- (10) Anti-obesity activity of an extracts from *Acanthopanax sessiliflorus* leaves
Kazuma Yoshizumi, Tomoko Tsuji, Yasuaki Hirai, Hidehiro Ando, Yoshiteru Ida,
Kaoru Murakami, Tamotsu Tanaka, Yasushi Kikuta, Kiyoshi Satouchi,
International Joint Meeting on Food Factors and Free Radicals in Health &
Disease (Kyoto) PROGRAM & ABSTRACTS, p.108, (2003-12)

More than 400 kinds of edible and medicinal plants were extracted with hot water, and the freeze dried extracts were subjected to a screening for inhibition on lipolytic activity by pancreatic lipase. Among them, extract of *A. sessiliflorus* leaves (AE) had a potential inhibitory activity, and its active principle was seemed to be triterpenoid type saponins. In general, plant extracts contain polyphenols, and they are known to inhibit enzyme activities by insolubilization of enzyme protein, so called tannic activity. In this study, we examined whether AE show a inhibitory activity for lipase in vivo or not.

- (11) Expression of leukotriene B₄ ω-hydroxylase in human leukocyte
Hideyuki Kunishi, Yuko Masumoto, Michie Eya, Junichi Ohta, Shiho Nishimoto,
Kiyofumi Nakata, and Yasushi Kikuta
13th International Conference on Cytochrome P450, Prague, Czech
Republic (2003-6,7)

Homogenates of the neutrophil rich fraction of human leukocytes catalyzed LTB₄ ω-hydroxylation activity (23.4 pmol/min/mg protein), and those of the monocyte rich fraction showed 11 times lower activity (2.1 pmol/min/mg protein). No activity was detected in the lymphocyte rich fraction. However, neutrophils contaminated into monocyte fraction can catalyze this activity. Then the expression of the CYP4F enzymes in human leukocytes was examined by immunocytochemistry. Western blot analysis with the antibody against CYP4F3 peptide showed the presence of a protein with the same apparent molecular weight as CYP4F3 in human neutrophil microsomes. When this antibody was used for the immunocytochemistry, fluorescence was observed in the cytoplasm of human leukocytes. Most of these positive cells had segmented nuclei. The double staining with anti-CD14 and anti-CYP4F3 antibodies showed that one third of CD14 positive cells, monocytes, were also stained by anti-CYP4F3 antibody. HL60 cells showed no LTB₄ ω-hydroxylase activity, and the cells stimulated by all-*trans*-retinoic acid (RA) for 6 days catalyzed the LTB₄ ω-hydroxylation. HL60 cells stimulated by TPA for 6 days also showed the slight activity. By immunocytochemistry, fluorescence was observed in the cytoplasm of the HL60 cells stimulated by RA or TPA for 4 and 6 days.

(1 2) Expression of leukotriene B₄ ω-hydroxylase in human leukocyte and HL60 cells

Yasushi Kikuta, Yoshiaki Yamashita, Souichirou Kashiwagi, Kazunori Tani, and Norifumi Nakata

第76回日本生化学会大会(横浜)、発表抄録集、P 9 7 7 (2003-10)

The enzymes of CYP4F subfamily were thought to be leukotriene B₄ (LTB₄) ω-hydroxylase, because CYP4F3, which is the first found enzyme in human leukocyte, powerfully catalyzes LTB₄ ω-hydroxylation reaction. Six members of human CYP4F subfamily have been found, and functional diversity of these enzymes was pointed out. In this study, we analyzed the expression of CYP4F subfamily in the human leukocytes.

In order to detect expression of CYP4F enzymes, the enzymatic activity assay, immunocytochemistry, and RT-PCR analysis of human leukocytes and HL60 cell were performed. The promoter activity of CYP4F3 gene was also analyzed using HL60 cell.

Human polymorphonuclear leukocyte (PMN) effectively catalyzed the LTB₄ ω-hydroxylase activity and expressed CYP4F3. mRNA for CYP4F3B and CYP4F12 was also detected in PMN. One third of monocyte in peripheral blood expressed CYP4F3, and LTB₄ ω-hydroxylase activity of the cell was 11 times lower than that of PMN. Lymphocyte did not express any isoform. Although, no isoform was expressed in a human myeloid leukemia cell line, HL60 cell, stimulations by retinoic acid (RA) or TPA for 4-6 days induced CYP4F3 expression in the cell. A region, -1832/-1306, was essential for the induction of CYP4F3 by RA stimulation in HL60 cell.

These findings suggest that the enzymes of the CYP4F subfamily have important physiological function in addition to LTB₄ inactivation, and the CYP4F3 expression closely relates to cell differentiation.

(1 3) Comparison between degrees of gelatinization of starches measured by different methods

Mayumi Takemoto, Naoyoshi Inouchi and Hidetsugu Fuwa, International Symposium on Polysaccharide Engineering 2003, Osaka Japan, Book of Abstracts, p.57 (2003-6)

Degrees of gelatinization (DG) of commercial normal corn and potato starches were measured by three kinds of methods [differential scanning calorimetry (DSC), β-amylase-pullulanase (BAP) method, and X-ray diffractometry]. The differences of DG

measured by three methods were also compared. Starches of normal corn and potato with different DG were prepared by heating 10% of starch suspension in a container of Rapid visco analyzer (RVA) at different temperatures. Heating conditions of RVA (temperature and time) were 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, 95°C, and 90min, respectively. Viscosity of normal corn and potato starches by RVA were observed in heating conditions at higher than 70°C and 60°C, respectively. Normal corn and potato starch pastes heated in a RVA container at each temperature were moved into a mortar, dried and powdered by stirring successively with ethanol, acetone and diethyl ether. They were used as powdered samples for DG measurement of starches. DSC endothermic peaks disappeared for powdered samples of normal corn and potato starches treated at higher than 65°C and 60°C, respectively. X-ray diffractograms of native normal corn starch and powdered samples prepared at 50°C and 55°C were almost same. Intensity of X-ray diffractograms of powdered samples of normal corn and potato starches prepared at higher than 60°C were lower than that of native starch. DG of powdered sample of normal corn starch measured by BAP method was different from DG measured by DSC and X-ray methods. There was difference in DG of powdered sample of normal corn starch measured between DSC method and X-ray method, while DG of powdered sample of potato starch was similar between different measuring methods.

(1 4) Classification of rice starches by structure and thermal properties

Tetsuya Horibata, Naoyoshi Inouchi, and Hidetsugu Fuwa, International Symposium on Polysaccharide Engineering 2003, Osaka Japan, Book of Abstracts, p.58 (2003-6)

Fine structure and thermal properties of endosperm starches of rice bred in Japan have been investigated. Content of apparent and true amylose (AM), super long chains (SLCs) and chain-length distributions of amylopectin (AP) were determined by GPC of isoamylase-debranched starches. Rice varieties were classified into four groups based on SLCs content in AP. Waxy rice starches (W-type) had no SLCs in AP. Low-AM and ordinary-AM rice endosperm starches named K-type had a small amounts of SLCs in AP. High-AM rice endosperm starches belonging to non-waxy rice were classified into two groups (H-type and Y-type) according to SLCs content. SLCs content of H- and Y-type were 4~7% and 13~15% in AP, respectively. Setback (SB) of H- and Y-type rice starches determined by RVA viscograms were greater than those for the W- and K-type rice starches, especially the SB of Y-type rice starches were extraordinary great. Very strong correlation was observed between SLCs content and SB values. This shows that SLCs

content rather than AM content affected SB values. Content of the peak areas (%) of short unit chains in AP were determined by HPAEC-PAD of isoamylase-debranched starches. Rice varieties used in this experiment were classified into four groups based on the peak area of fraction A (Fr.A) corresponded to unit chains with DP of 6~12. Their four groups were named XL-type (amylose-extender mutant), L-type (popular Indica cultivars), S-type (popular Japonica cultivars) and XS-type (sugary mutant rice). The lower the content of Fr.A are, the higher gelatinization temperatures (GT) and enthalpy changes (ΔH) for gelatinization become. Furthermore, there was no significant difference in GT and ΔH for gelatinization between non-waxy and waxy rice starches. This result shows that GT and ΔH for gelatinization of rice starches are affected not by AM content but by short unit-chain distributions of AP. Finally, we made "rice-classification map" from fine structure and thermal properties of rice endosperm starches. Texture of cooked rice largely affected by the starch properties seems to be easily estimated by the "rice-classification map".

(1 5) Retrogradation of polished rice grains and rice starches

Masaaki Nakamoto, Tetsuya Horibata, Naoyoshi Inouchi and Hidetsugu Fuwa, International Symposium on Polysaccharide Engineering 2003, Osaka Japan, Book of Abstracts, p.59 (2003-6)

Retrogradation of rice starches [waxy (Hiyokumochi), low amylose (Snow pearl, Milky queen), ordinary amylose (Koshihikari), long side-chain amylopectin (Akeno-hoshi)] and middle amounts of super long chains (SLCs) (Hoshiyutaka), and high amounts of SLCs (Yumetoiro) types] and their polished rice grains have been investigated by using several methods. Hoshiyutaka(H) and Yumetoiro(Y) are generally known as a high amylose rice whose amylose contents are about 30%. However, there was significant difference of setback values (a kind of index of starch retrogradation) between (H) and (Y) rice powders. Polished rice grains in water [rice grains : water = 1 : 1.3(w/w)] were heated from 30°C to 120°C in a differential scanning calorimeter (DSC) (Setaram micro DSC III, Caluire, France) pan at the heating rate of 1°C/min by a modification of method of Inouchi et al., and then, the rice grains heated in the pan were stored at 5°C for 7 days. The retrograded rice grains were dehydrated and powdered. The degrees of retrogradation of the powdered rice samples were measured by β -amylase-pullulanase (BAP) method. Results of measurement showed that high content of true amylose, long side-chains, and SLCs in amylopectin advanced retrogradation of rice grains. Retrograded starches in a DSC pan showed higher amounts of enthalpy changes with increasing storage time. This result shows that the enthalpy changes of retrograded

starches can become an index of degrees of retrogradation.

(16) 夢十色胚乳澱粉の性質に及ぼす生育温度の影響

堀端哲也、猪谷富雄、中浦嘉子、井ノ内直良、不破英次

日本応用糖質科学会大会（仙台）、*J. Appl. Glycoscience*, 50(3), p.434 (2003-9)

(目的)アミロースを合成する Wx 遺伝子(結合型澱粉合成酵素; GBSS)は、インデ
ィカ品種に多い高発現型である Wx^a、ジャポニカ品種に多い低発現型である Wx^b
の多型が知られている。Wx^bを持つ稲の胚乳澱粉のアミロース含量は低温で増加
することが知られている¹⁾。日印交雑品種である夢十色(Wx^a)胚乳澱粉の性質に
及ぼす生育温度の影響を調べた。(方法)試料として広島県立大学水田で栽培され、
人工気象管理室で積算温度 1000℃で低温(25℃)、高温(30℃)条件で完熟させた試
料米の夢十色から冷アルカリ浸漬法により調製した胚乳澱粉を用いた。アミロペ
クチンの精製、ヨウ素吸収曲線、酵素・クロマト法による溶出曲線、HPAEC-PAD
法によるアミロペクチンの短鎖領域の側鎖長分布、胚乳澱粉の DSC による糊化
特性、RVA による粘度特性などの測定は常法により行った。(結果)低・高温条件
の違いによって見かけ・真のアミロース含量、アミロペクチン中のスーパーロン
グチェーン含量に大きな差はなかった。アミロペクチンの短鎖の割合は、台中 65
号と同様に、低温での生育温度の方が高温よりも高かった。

(17) 市販の雑豆種子澱粉の性質

井ノ内直良、鈴木健太、安藤直樹、中里滋希、不破英次

日本応用糖質科学会大会（仙台）、*J. Appl. Glycoscience*, 50(3), p.435 (2003-9)

(目的) マメ類は、澱粉を主成分とする豆、例えばインゲンマメ、ナタマメ、ア
ズキ、エンドウ、ソラマメなどの雑豆類と、タンパク質および油脂を主成分とす
る豆、例えばダイズ、ラッカセイに大別される。雑豆類の種子澱粉は、一般に高
アミロースタイプであることが知られている。今回市販されている雑豆類の種子
中の澱粉の性質を調べた。(方法)市販のマメ種子(インゲン9種、ナタマメ2
種、アズキ1種、エンドウ11種、ソラマメ3種)から澱粉を調製し、ヨウ素・
澱粉複合体吸収曲線、酵素・クロマト法によるアミロース含量とアミロペクチン
の鎖長分布、HPAEC-PAD によるアミロペクチンの短鎖領域の側鎖長分布、DSC
による糊化温度と糊化熱量、RVA による粘度曲線、X 線回折図形などの測定を
行った。またエンドウ類の澱粉からアミロペクチンを精製し、その側鎖長分布を

調べた。(結果)市販の雑豆種子澱粉のヨウ素・澱粉複合体吸収曲線の最大吸収波長はいずれも 600nm 以上と、市販のトウモロコシ澱粉の 597nm に比べて高く、特にスナックエンドウ類の澱粉は 615nm 以上と高い値を示した。HPLC を用いた酵素・クロマト法による見掛けのアミロース含量はトウモロコシ澱粉の 25% と比べて、ほぼ同じアズキ澱粉を除くといずれの雑豆種子澱粉もほぼ 30% 以上であり、特にスナックエンドウ類の澱粉は 60% 近い値を示した。スナックエンドウ類の澱粉は糊化しにくく、アミロペクチンの短鎖の割合が低く、X 線回折図形は B 図形を示したことから高アミローストウモロコシ澱粉に似た性質を示した。エンドウ類のアミロペクチンには超長鎖が含まれていた。

(18) 米アミロペクチンの超長鎖合成の遺伝解析

青木法明、梅本貴之、石井尊生、吉田晋弥、上島脩志、松倉潮、井ノ内直良

日本育種学会第 104 回講演会(神戸)、育種学研究 5(別 2) p.210 (2003-9)

デンプンはアミロース、アミロペクチンの 2 種類の多糖から構成されている。アミロペクチンは多くの枝分かれをもつ構造をしているが、その中に極めて長い側鎖の存在が明らかになっている。このアミロペクチン超長鎖の含量と米の食味・加工性への関与が示唆されているが、合成機構は未だに明らかになっていない。本研究では超長鎖の合成機構を明らかにすることを目的として、まずは遺伝解析を行った。(材料と方法) 供試系統は超長鎖含量が少ない兵庫北錦と、多い北陸 142 号(後の夢十色)の Recombinant Inbred Lines(RILs)158 系統(F₅)である。超長鎖含量と Rapid Visco Analyzer におけるセットバックとは高い相関があることから、同数値を超長鎖含量の指標とした。分子マーカーはイネゲノムプログラムから公開されている Simple Sequence Repeat (SSR)マーカー 62 個と、Wx 遺伝子のアレル(Wx^aと Wx^b)を判別する Cleaved amplified polymorphic Sequence (CAPS)マーカーを用いた。また、変異原処理(1mM NaN₃)した夢十色種子から糯変異株をスクリーニングし、M3 種子の胚乳からデンプンを精製して超長鎖含量の測定に用いた。(結果と考察) 解析の結果、Wx マーカーの遺伝子型とセットバックとの間には極めて明確な関係が認められた。Wx の遺伝子型が北陸 142 号型(Wx^a)である場合、1 系統を除きセットバックが 200RVU 以上の値を示した。一方、兵庫北錦型(Wx^b)である系統は全てセットバックが低かった。セットバックが 200RVU 以上であった系統のアミロペクチンの超長鎖含量を測定したところ、全て 10%以上の超長鎖を含むことが確認された。また、夢十色の糯変異株のデンプンを調べた結果、超長鎖が検出できなかった。これらの結果から Wx 遺伝子がアミロペクチンの超長鎖合成に関わることが示唆された。

粳系統は、アミロペクチンの超長鎖の含量が多い(12%以上)系統群、中程度(4~

8%)の系統群と、少ない(3%以下)系統群に分類される。これまでに超長鎖を中程度に含む Wx^a 系統の糯変異株にも超長鎖が含まれないことから、中程度の超長鎖含量の系統における超長鎖合成にも Wx 遺伝子の関与が示唆されていた。兵庫北錦(超長鎖少)と北陸142号(超長鎖多)のRILsに中程度の超長鎖含量の系統が極めて少なかったことから、 Wx^a 遺伝子の中でもさらに多型が存在し、超長鎖含量と対応している可能性がある。

(19) *alk* 候補遺伝子としてのイネ澱粉合成酵素 *Ila* にみられる自然変異の特性解析

梅本貴之、青木法明、林鴻宣、中村保典、井ノ内直良、佐藤洋一郎、矢野昌裕、丸山幸夫

日本育種学会第104回講演会(神戸)、育種学研究5(別2) p.357 (2003-9)

イネの澱粉合成酵素 *Ila* (*SSIla*) 遺伝子は、米粒のアルカリ崩壊性を制御する第6染色体の *alk* 座に位置し、その酵素機能にアルカリ崩壊性の異なる品種間で多型の見られることから *alk* 候補遺伝子とされている。本研究では、「日本晴」遺伝子型背景にインディカ品種「Kasalath」の *alk* 座近傍領域を取り込んだ準同質遺伝子系統(NIL(*Alk*))を用い、炊飯米の食味および澱粉特性への影響を解析した。さらに *SSIla* 遺伝子に見られるアミノ酸置換を伴う1塩基多型(SNP)と澱粉特性の関連についても解析を行った。(材料および方法)食味試験および澱粉特性の解析には、日本晴とNIL(*Alk*)を供試した。澱粉糊化特性は示差走査熱量計(DSC)を用いて測定した。*SSIla* のSNP解析には、栽培品種41系統、主に中国、日本の在来種24系統、計65系統を供試し、SNaPshot kit (ABI)によって検出した。また、アルカリ崩壊性は1.7% KOH 溶液を用いて判定し、アミロペクチン鎖長分析には高性能陰イオン交換クロマトグラフィー・パルスドアンペロメトリック検出法を用いた。(結果と考察)NIL(*Alk*)の炊飯直後の粘りは日本晴とほぼ同程度であったが、冷飯は極めて粘らなかった。硬さ、総合評価についても炊飯直後と冷飯の評価は大きく異なった。硬さはNIL(*Alk*)で硬く、総合評価も劣った。一方、糊化澱粉の老化程度の指標となる再糊化時の吸熱量は、NIL(*Alk*)で日本晴の2倍以上大きく、老化の進展が示唆された。この老化程度の違いが、冷飯の食味評価の差につながったと考えられた。

アルカリ崩壊性の異なる日本晴とKasalathの*SSIla* cDNA塩基配列には、アミノ酸置換を伴うSNPが3箇所確認されている。これらのタイピングを65系統について行ったところ、4つのハプロタイプが確認された。遺伝子産物の酵素活性が確認されているハプロタイプCGGとGGGの系統は、いずれもアミロペクチンの短鎖比率が小さかった。CAAでは逆に同比率が大きく、CAGは同比率の

小さいものと大きいものに分かれた。ハプロタイプとアルカリ崩壊性との関連は、GGG を除き鎖長比率と類似した分布を示した。以上、SSIIa 遺伝子のハプロタイプとアミロペクチン分子構造の間には関連が認められるとともに、2 番目の SNP の重要性が示唆された。

(20) Aminopeptidase B (rat) 中に含まれる亜鉛イオンの錯体化学的性質
廣瀬順造、箕浦誉敏、岩本博行、上垣内宏司、深沢勝彦、深沢加与子
日本薬学会 2003 年大会 (長崎)、講演要旨集 p. (2003-3)

Aminopeptidase B は 1 分子中に 1 原子の亜鉛イオンを含む亜鉛含有酵素で、その亜鉛結合部位と思われる HExxH モチーフを持つ、深沢らとの共同研究により亜鉛イオンに配位すると思われる His 残基の部位特異的変異酵素を作成し、亜鉛イオンが HExxH のモチーフ上の 2 つの His 残基と、そのモチーフから 18 残基離れた Glu に結合している事が判った (Biochem. J. (1999))。今回我々は、酵素中の亜鉛イオンの結合定数を測定したので報告する。亜鉛イオン金属緩衝液で酵素を incubate したところ、酵素活性は遊離の亜鉛イオンが減少するにつれて、酵素活性を失った。遊離の亜鉛イオンの対数値と残存する酵素活性の関係はシグモイド曲線となった。この関係から酵素と亜鉛イオンが 1:1 で結合すると考え、次式 (1) の理論式にこの結果を当てはめ、亜鉛イオンの酵素に対する結合定数を求めた。

$$K_M = [EM]/([E][M]) \quad (1)$$

K_M : 結合定数 EM: 亜鉛イオンが結合した酵素 E: アポ酵素 M: 亜鉛イオン

その値は、 $4 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ となった。この値は、多くの亜鉛含有酵素のそれと非常に類似していた。

(21) 酵素活性発現に果たす Dipeptidyl peptidase III 中の亜鉛イオンの役割
廣瀬 順造, 上垣内 宏司, 藤井 秀晃, 仲井 正憲, 岩本 博行, 深沢 加与子
日本農芸化学会 2003 年度大会 (東京)、大会講演要旨集 p.107 (2003-4)

我々は、Dipeptidyl Peptidase III (Zn-DPP III) が亜鉛イオンを 1 分子あたり 1 原子含み、また酵素のアミノ酸配列に、HExxxH...E のモチーフ配列を見いだしたが、これは亜鉛ペプチダーゼに知られる亜鉛結合モチーフ配列 HExxH...E にもう一残基のアミノ酸がヒスチジン間に加わった新規なモチーフ配列であった。そこで、今回 Zn-DPP III の HExxxH...E のモチーフ配列の x として存在する Leu を一つ取り除いた部位特異的変異体 del-Zn-DPP III を作成し、酵素中

の亜鉛イオンを種々の金属イオンに置換し、その酵素化学的性質を検討した。del-Zn-DPP III 中の亜鉛イオンをキレート化剤で除去した後、種々の金属イオンを加えて、金属置換-DPP III を調製した。Zn-DPP III 中の亜鉛イオンを銅イオンに置き換えた Cu-DPP III は Zn-DPP III とほぼ同じ活性を示したが、del-Zn-DPP III 中の亜鉛イオンを銅イオンに置き換えると、del-Cu-DPP III の活性は 20 % 程度まで大きく低下した。この挙動は、酵素の蛋白構造と深く関係していると思われる。

(2 2) *Klebsiella pneumoniae* 由来プルラーゼにおける金属イオンの役割

岩本博行、亀田綾、江川まりえ、廣瀬順造

日本農芸化学会 2003 年度 (平成 15 年度) 大会 (藤沢)、講演要旨集、P.98 (2003-4)

Klebsiella pneumoniae 由来プルラーゼは、 α -アミラーゼファミリーに属する分子量約 12 万のデンプン枝切り酵素である。本酵素の X 線結晶構造解析において、酵素 1 分子あたり Ca あるいは Mg と推定される電子密度が 5 ヶ所観察された。そこで本研究ではまず酵素中に含まれる金属イオンを定量し、次に一部の金属イオンを抜き取った酵素、および金属を再構成した酵素を作製し、その性質を調べることにより金属イオンの役割について検討した。酵素活性は、プルランを基質とし、還元力の増加により求めた。原子吸光分析の結果、本酵素 1 分子中に Ca が 5 原子と、Mg が 1 原子含まれることがわかった。酵素を EDTA に対して透析すると、Ca 1~2 原子を残して他の金属イオンは除去された。この様にして調製した金属抜き酵素は、Native 酵素に比べて熱安定性、至適温度とも 5~10℃低下した。また各種プロテアーゼ消化に対する抵抗性も低下した。金属抜き酵素に再び Ca や Mg を添加すると、金属イオンが再構成され、各種性質も Native 酵素と同等まで回復した。

(2 3) 回帰熱ボレリア *Borrelia turicatae* 菌体表層蛋白質 VspE の抗原決定基の解析

田淵紀彦、岩本博行、川口博史、福永将仁

日本細菌学会第 76 回総会 (熊本)、講演要旨集、P.291 (2003-4)

回帰熱ボレリア *Borrelia turicatae* 菌体表層蛋白質 (variable major protein, Vmp) は抗原変換に関与し、宿主血液中で菌体が回帰 (増殖と消失) するための血清型を与える蛋白である。さらに、その構成アミノ酸組成は宿主感染時での菌体の組織指向性 (tissue tropism) に関与することが知られている。我々の研究室で継代培養した *B. turicatae* をスナネズミ感染させたとき 23 kDa 蛋白質

が主に発現し、回帰後では異なる分子量の蛋白発現が認められた。そこでこの 23 kDa 蛋白質の同定および推定立体構造からこの蛋白質の抗原変換に関わる抗原決定基の検討を行った。*Borrelia turicatae* を BSKII 培地で培養後スナネズミ感染時に発現する 23 kDa 蛋白質を、常法にし従い部分アミノ酸配列を決定し 23 kDa 蛋白遺伝子のクローニングを行い、215 アミノ酸残基からなる VspE をコードする遺伝子を単離した。*B. turicatae* Oz-1 で発現した VspE とは 97.2% の similarity を示し、また *B. turicatae* VspA, B, D, F、いずれも高い (>58%) similarity があり特に VspA とは 70.1% で高値を示した。また PDB に登録されているライム病起因菌 *Borrelia burgdorferi* B31 菌体表面層蛋白 OspC をもとに VspE の立体構造を推定したところ、VspE は 4 つの α -helix 構造で構成され、38.6% の similarity にも関わらず OspC と極めて類似した構造であることが推察された。また α -helix 構造間の 3 ヶ所の loop 構造において Vmp ファミリー間で可変領域が認められ、そのうち 2 ヶ所の領域が蛋白の最外部に位置していた。従ってこれらの領域が抗原決定基となる可能性が推察された。

- (24) Dipeptidyl peptidase III 上の亜鉛結合モチーフの 453 番目の Leu を除去した部位特異的変異体 Leu(453)-delete-dipeptidyl peptidase III の性質
廣瀬 順造、上垣内 宏司、藤井 秀晃、中井 正憲、岩本 博行、深沢 加与子
第 13 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (千葉)、講演要旨集 p32-33 (2003-6)

Dipeptidyl peptidase III 上の亜鉛結合モチーフ(HELLGH)中の Leu を除去し、サーモライシンと同じ様な亜鉛モチーフ(HELGH)構造を持つ部位特異的変異体を作成し、亜鉛イオンを除去し、種々の金属イオンで活性の回復率を検討した所、亜鉛イオンやコバルトイオンでは活性が大きく回復したが、銅イオンでの活性回復率が大きく低下 (亜鉛イオンの 15% 程度) した、この事は蛋白部位の構造が大きく酵素活性に影響している事している。

- (25) Is the Zinc Ion of dipeptidyl peptidase III directly Involved in catalyzing the substrate ?
Junzo Hirose, Hiroshi Kamigakiuchi, Hiroyuki Iwamoto, Kayoko M Fukasawa
11th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC),
J. Inorg. Biochem., 96(1), p145 (2003-7)

Dipeptidyl peptidase III (DPP III) (EC 3.4.14.4), which has a HELLGH..E (residue 450-

455, 508) motif as the zinc binding site, is classified as a zinc metallopeptidase (1, 2). But the zinc binding motif (HExxxH (x : appropriate amino acid)) of DPP III is different from that of common zinc binding motif (HExxH) like thermolysin. The copper derivative of thermolysine or carboxypeptidase A, well known zinc-peptidase, has no or little peptidase activity, but the copper derivative of DPP III (Cu-DPP III) showed high peptidase activity for Arg-Arg-NA, the substrate (2). It is the big question whether the zinc ion of DPP III is directly involved in catalyzing the substrate or not. To answer this question, EPR spectra of Cu-DPP III were measured in the presence of the competitive peptide inhibitor, Hisprophen (His-Pro-Phe-His-Leu-d-Val-Tyr). The EPR spectra of the adduct with Hisprophen was completely different from that of Cu-DPP III itself. This result clearly indicates that the copper ion in Cu-DPP III directly interacts with the competitive peptide inhibitor. To clarify the importance of the motif part (HELLGH) in DPP III, the recovery of the enzyme activity of apo-Leu453 deleted DPP III, which has the motif (HELGH) like thermolysin, and apo-DPP III were measured in the presence of cupric ions. The enzyme activity of apo-Leu453 deleted DPP III could not be recovered by the addition of cupric ions, while apo-DPP III could be easily reactivated by the addition of cupric ions. These observations indicate that the metal is directly involved in the expression of the enzyme activity and the motif part in DPP III influences the expression of the enzyme activity.

(26) イネ胚乳プルラーゼの性質および微生物由来プルラーゼとの比較

岩本博行、作田郁恵、新元芳彦、廣瀬順造、久保亜希子、中村保典

日本農芸化学会西日本支部、中国・四国支部、日本栄養・食糧学会西日本支部、日本食品科学工学会西日本支部平成 15 年度鹿児島合同大会（鹿児島）、講演要旨集、P.12 (2003-9)

高等植物に存在する澱粉枝切り酵素は、澱粉の分解ばかりでなくアミロペクチンのクラスター構造形成に関与していることが明らかにされつつある。この働きは主にイソアミラーゼが担っているとされるが、プルラーゼも相補的な役割を持つと推定されている。本研究では、イネ胚乳由来プルラーゼの酵素化学的・反応速度論的性質を調べ、微生物由来のプルラーゼと比較した。実験に用いた酵素は、登熟期のイネ種子から精製した。酵素活性はプルランを基質とし、還元力の増加を Park-Johnson 法で測定した。酵素は pH が 5.5 から 7.5 の間で最大活性を示したので、以後 50 mM 酢酸緩衝液(pH 5.6)中で活性を測定する事とした。次に至適温度を調べたところ、50℃付近で活性が最大となった。イネプルラーゼの K_m (ミカエリス定数)および k_{cat} (モル活性)や、シクロデキストリンによる阻害物質定数(K_i)は、微生物 *Klebsiella* 由来プルラーゼとよく似た値を示した。

一方、マルトオリゴ糖(アルコール)との相互作用では、イネ酵素と *Klebsiella* 由来酵素の間に違いが見られ、両酵素で基質結合部位の構造が異なることが示唆された。

(27) Is the zinc ion of dipeptidyl peptidase III directly involved in catalyzing the substrate?

Junzo Hirose, Hiroshi Kamigakiuchi, Hiroyuki Iwamoto, Kayoko M. Fukasawa
第76回 日本生化学会大会(横浜)、講演要旨集 p1082 (2003-10)

Dipeptidyl peptidase III (DPP III) (EC 3.4.14.4) has a HELLGH..E (residue 450-455, 508) motif as the zinc binding site. But the zinc binding motif (HExxxH) of DPP III is different from that of common zinc binding motif (HExxH) like thermolysin. The copper derivative of thermolysin has little peptidase activity, but the copper derivative of DPP III (Cu-DPP III) showed high peptidase activity for the substrate. To clarify the importance of the motif part (HELLGH) in DPP III, the recovery of the enzyme activity of apo-Leu453 deleted DPP III, which has the motif (HELGH) like thermolysin, and apo-DPP III were measured in the presence of cupric ions. The enzyme activity of apo-Leu453 deleted DPP III could not be recovered by the addition of cupric ions, while apo-DPP III could be easily reactivated by the addition of cupric ions. These observations indicate that the motif part in DPP III influences the expression of the enzyme activity.

It is the big question whether the zinc ion of DPP III is directly involved in catalyzing the substrate or not. To answer this question, the EPR spectra of Cu-DPP III were measured in the presence of the competitive peptide inhibitor, Hisprophen (H-P-F-H-L-d-V-Y). The EPR spectra of the adduct with Hisprophen was completely different from that of Cu-DPP III itself. This result clearly indicates that the metal ion in DPP III directly interacts with the substrate.

(28) 細菌由来アラビノキシラン分解酵素生産菌の培養条件とその酵素の性質

倉掛昌裕、浅野治、谷本裕子、小巻利章

日本農芸化学会 2003 年度大会(横浜)、大会講演要旨集、p 103 (2003)

(目的) 土壌よりアラビノキシラン分解菌の検索を行ったところ、アラビノキシランからアラビノースのみを遊離する酵素の生産菌 MK5 株が得られた。ここでは液体培養による酵素生産のための培養条件およびその酵素の諸性質を調べた。

(方法) アラビノキシラン(和光純薬工業(株)製)はとうもろこし種皮由来のもので、構成単糖の組成比がアラビノース / キシロース = 0.6 と、アラビノース

組成が高いものを用いた。菌の分離培地には 1%アラビノキシランのみからなる寒天平板培地を用い、培養温度は 30℃とした。液体培養には主に 1%アラビノキシラン、0.5%酵母エキス、0.2%りん酸水素 2 ナトリウム 12 水和物の液体培地を用い、30℃で振とう培養した。酵素活性は 1%アラビノキシラン、pH 5、30℃で 10 分間作用させ、遊離する還元糖量を 3,5-ジニトロサリチル酸法により測定することで求めた。1 分間に 1 μ mol の還元糖を生産する酵素量を 1U と定義した。

(結果) MK5 株の液体培養における炭素源の影響について調べたところ、とうもろこし種皮アラビノキシランおよびオートスペルトキシランにて酵素の誘導が認められた。アラビノース、キシロース、グルコース等の糖類では菌体はよく生育するものの、酵素生産性はほとんどなかった。生産酵素を 4%のアラビノキシランに作用させたところ、HPLC 分析にて効率良くアラビノースのみを遊離することがわかった。その他培養条件の検討および酵素の性質について調べた。

(29) *Aspergillus oryzae* KB の 2 種 β -フルクトフラノシダーゼの生産条件

倉掛昌裕、占部友弘、杉江基希、小巻利章

日本応用糖質科学会 2003 年度大会(仙台)、J. Appl. Glycoscience, 50(3), 429 (2003)

【目的】 *Aspergillus oryzae* KB は 2 種の β -フルクトフラノシダーゼ F1 および F2 を生産した。F1 はフルクトース転移性の高い酵素であるのに対し、F2 は加水分解性の高い酵素であった。今回は、両酵素の培地等の生産培養条件を検討するとともに、各酵素の機能について考察した。

【方法】 KB 株の液体培養はシュクロース 1 および 5 %、酵母エキス 1%、りん酸水素 2 ナトリウム 12 水和物 0.2%の培地にて、30℃、140rpm で行った。培養液を 30ml とし、100ml 三角フラスコにて培養した。KB 株 β -フルクトフラノシダーゼの転移活性 (Ut) および加水分解活性 (Uh) は 20%シュクロースに、pH 5、40℃、60 分で作用させ、生成糖を HPLC (カラム: NH2P-50 [旭化成]) により分析することで求めた。なお、Ut は F1 酵素、Uh は F2 酵素の活性と関連した。

【結果】 1%シュクロース培地では培養日数に伴い、培養液の Ut および Uh は高くなり、特に Uh が高くなった。一方、5%シュクロース培地では Ut が培養 1 日目から高くなるのに対し、Uh は低く、培養日数に伴う増加は見られなかった。すなわち 1%シュクロース培地では F2 が、5%培地では F1 がより選択的に生産されることがわかった。この時、培養液の pH がそれぞれアルカリ性および酸性となることより、培地 pH と各酵素活性値との関係を調べたところ、pH

が両酵素生産に影響することが認められた。

B. 総説

- (1) 1,2位ともに高度不飽和脂肪酸が結合したリン脂質分子種の生合成とその機能
里内 清
杉山産業化学研究所年報 (平成15年) p. 79-90 (2003)

エイコサペンタエン酸、またはドコサヘキサエン酸といったシス型の二重結合を5個や6個も持った高度に不飽和化した脂肪酸が sn-1, 2位ともに結合したグリセロリン脂質分子種が魚の筋肉およびモデル実験動物である線虫に多量に存在する。本稿ではこの高度不飽和脂肪酸結合型分子種について、生合成の機序について述べるとともに、その存在の意義について考察した。

- (2) 澱粉の構造と機能特性
井ノ内直良、不破英次
Foods Food Ingredients J. Jpn, 208(11), 特集：食品における多糖類の構造と物性(2), 895-902 (2003)

澱粉科学入門、澱粉の多様性、澱粉研究の難しさと楽しさ、澱粉の研究方法、澱粉の糊化と老化、澱粉の糊化に影響を及ぼす要因、澱粉の老化に影響を及ぼす要因、難消化性澱粉（レジスタントスターチ）、米澱粉および白米のアミロペクチン分岐鎖と澱粉の糊化・老化との関係、今後の展望について解説した。要点は以下の通りである。

澱粉は緑色植物が葉緑体の助けを借りて二酸化炭素と水から太陽エネルギーを利用して合成され、種実、根や茎に貯えられる貯蔵多糖（ α -1,4-, 1,6-多糖）であり、アミロースとアミロペクチンの2つの主要成分から成り立っている。澱粉の糊化と老化特性は食品産業に非常に大切である。最近、澱粉の糊化と老化特性に及ぼすアミロペクチン側鎖の影響が、澱粉構造と機能性間の関係を調べる研究の中でもホットな話題となっている。

植物の種類異なる澱粉粒は大きさ、形状が非常に異なり、構造や物性も大きく異なっている（澱粉の多様性）。澱粉研究特有の実験方法の難しさとやりがい、澱粉の糊化と老化に及ぼす要因、難消化性澱粉（レジスタントスターチ）の定義などにも言及し、最後に日本で育成された米品種の胚乳澱粉の性質においても、

澱粉中のアミロペクチン分子のクラスター構造を構成している側鎖と超長鎖含量が、それぞれ澱粉の糊化温度や老化性と深い関係があることを解説した。

C. 著書

- (1) Expression of leukotriene B₄ ω-hydroxylase in human leukocyte
Hideyuki Kunishi, Yuko Masumoto, Michie Eya, Junichi Ohta, Shiho Nishimoto,
Kiyofumi Nakata, and Yasushi Kikuta
Cytochrome P450, Biochemistry, Biophysics and Drug Metabolism,
Anzenbacher P., Hudecek J., Monduzzi Editore, in CD ROM, (2003)

Leukotriene B₄ (LTB₄), a product of the 5-lipoxygenase-dependent arachidonic acid metabolism, plays a role as the most powerful mediator of inflammation. In human neutrophils, LTB₄ is rapidly converted into biologically less active products by the ω-oxidation pathway. The LTB₄ ω-hydroxylase, which catalyzes the first step of this pathway, is classified as the CYP4F subfamily. In this study, we have analyzed the expression of CYP4F enzyme in human peripheral leukocytes and human myeloid leukemia cell line HL60 by immunocytochemistry.

Although CYP4F3 is the major CYP4F isoform in PMNs and in HL60 cells stimulated with retinoic acid, mRNAs for CYP4F3B and CYP4F12 were also detected in these cells. CYP4F3 was also expressed in the monocytes and HL60 cells stimulated with phorbol ester. Thus, CYP4F3 is expressed in human PMNs, monocytes, and cells differentiated into forms shaped like them.

- (2) 澱粉の調製法と定量法

井ノ内直良

澱粉科学の事典、不破英次、小巻利章、檜作 進、貝沼圭二 編著、朝倉書店
p.153-156 (2003) (全 554 ページ)

第1編 澱粉の基礎科学の6.澱粉の分析法および試験法の中で、6.1として、各種植物からの澱粉の調製法と澱粉の抽出法と定量法について解説した。要点は以下の通りである。

a. 調製法

澱粉の研究を進める第一歩は、まず植物試料中に含まれている澱粉粒だけのできる限り物理的および化学的修飾を加えずに試料澱粉として取り出すことである。澱粉は植物細胞内のプラスチド内で顆粒状に存在しているので、澱粉を抽出するためには、細胞膜とさらにその中に含まれているプラスチドの膜を破壊しなければならない。澱粉は植物細胞の他の構成成分に比べて、比重が約 1.5 と大きく、冷水に不溶であるという特徴をもっている。その特徴を利用して植物細胞組織を水中で機械的に破碎した後、その懸濁液を静置あるいは遠心分離などによって沈殿させることにより、基本的に他の成分と分離することが可能であり、あまり困難な作業を必要としない。実験室的な規模で純粋な澱粉本来の性質を研究するためには、まだ澱粉中に微量に含まれているタンパク質、脂質、無機質といったその他の成分を除去するために、さらに澱粉を精製する必要がある場合が多い。

b. 定量法

植物あるいは食品の試料中の澱粉を定量するためには、試料から澱粉を完全に抽出し、それを定量するという 2 段階の操作が必要となる。試料中の澱粉を澱粉調製時のような穏和な条件で抽出する必要はなく、また穏和な条件では完全に抽出することは困難であるので、熱水、アルカリ、過塩素酸、ジメチルスルホキシドなどの澱粉を十分に溶解させる抽出液が用いられる場合が多い。

(3) アミロースとアミロペクチンの分別と定量法

井ノ内直良

澱粉科学の事典、不破英次、小巻利章、檜作 進、貝沼圭二 編著、朝倉書店 p.156-160 (2003) (全 554 ページ)

第 1 編 澱粉の基礎科学の 6.澱粉の分析法および試験法の中で、6.2として、澱粉のアミロースとアミロペクチンの分別法（温水抽出法、アミロース沈殿剤を用いる方法、ゲルろ過法、精製したアミロースとアミロペクチンの検定法）と定量法（ヨウ素を用いる定量法、酵素・クロマト法、その他の定量法）について解説した。要点は以下の通りである。

a. 分別法

澱粉の構成成分であるアミロースとアミロペクチンの構造研究は、その 2 成分の発見以後、急速に進展したが、この 20 年間で定量的な構造研究が飛躍的に進歩した。その基本となったのが、澱粉の 2 成分の精製法の進歩であり、各種

酵素を組み合わせた分析法の開発とクロマト法を中心とする分析機器の導入などである。澱粉の2成分を分離する方法として、温水抽出法、アミロース沈殿剤を用いる方法、およびゲルろ過法がある。

b. 定量法

澱粉中のアミロースとアミロペクチンの含量を測定する際に、澱粉はその2成分だけから構成されていると考えると、一方を定量すれば他方は計算で求めることができる。そしてほとんどの場合、アミロース含量の方がもっぱら定量されている。アミロースとアミロペクチンの定量法として最もよく用いられている方法は、ヨウ素によるアミロースの定量法と酵素・クロマト法である。

D. その他

- (1) 国産ウコギからの有用成分の抽出と食品素材化技術の開発
吉積一真、千葉智尋、大野智弘、里内 清、村上 薫
平成 14 年度農林水産省国産農産物利用食品産業技術開発支援事業地域農産物利用技術開発成果報告書 p. 1-18 (2003)
- (2) 新系統・育種素材の澱粉の微細構造と糊化・老化特性の関係の解明
井ノ内直良
平成 14 年度農業技術研究機構「食糧自給率向上のための 21 世紀の土地利用型農業確立を目指した品種育成と安定生産技術の総合的開発 (21 世紀プロ)」5 系：画期的新品種の創出等による次世代稲作技術の開発推進会議資料 p. 164-165 (2003-2)
- (3) 環境と人間
山本英二
分離技術、33(2), 151 (2003)